

TESTING FOR HER-2/C-ERBB-2 VED INVASIVE
BRYSTCARCINOMER:
IN SITU HYBRIDISERING MED KORREKSJON
FOR KROMOSOM 17 BØR FORETREKKES
FREMFOR IMMUNHISTOKJEMI

Prosjektoppgave i profesjonsstudiet i medisin

Ved: Kjartan Moe (kull H-00)

Veileder: Prof. Torill Sauer
(Patologisk anatomisk avdeling, Ullevål universitetssykehus)

Innholdsfortegnelse

<i>Innholdsfortegnelse</i>	2
<i>Abstract</i>	2
<i>Innledning</i>	3
<i>C-erbB-2/Her-2 og invasiv brystkreft: In situ hybridisering bør foretrekkes fremfor immunhistokjemi for å påvise amplifikasjon/overekspressjon</i>	4
Metode	4
Resultater	5
Diskusjon	7
Konklusjon	7
<i>In situ hybridisering for c-erbB-2 ved invasiv brystkreft: Korrigering for kromosom 17 er nødvendig</i>	8
Metode	8
Resultater	10
Diskusjon	11
Konklusjon	13
<i>Referanser</i>	13

Abstract

Background: Amplification/overexpression of c-erbB-2/Her-2 can predict the prognosis and the efficiency of certain chemotherapeutics, especially the Her-2-antagonist trastuzumab, in breast cancer. Whether immunohistochemistry(IHC) or fluorescence in situ hybridization(FISH) is more suitable for detecting amplification/overexpression is controversial. This study aimed to clarify this. Furthermore we wanted to decide if it is sufficient by FISH to only test for gene amplification, or if it is necessary to correct for the chromosome 17-number to see which tumours are amplified for c-erbB-2 and which are polysome.

Methods: Cochrane and Pubmed databases were searched for reviews on IHC versus FISH in detecting overexpression/amplification of Her-2/c-erbB-2. Next; 26 biopsies from ductal carcinomas were marked for chromosome 17 with chromogenic in situ hybridization(CISH). Chromosome-number pr cell was calculated, compared to c-erbB-2-copies pr cell and to the tumours' IHC-positivity.

Results: The literature on the subject was of poor quality. No reviews were systematically written. Most advocated testing by IHC primarily and testing IHC 2+-tumours with FISH. A number of others advocated FISH as the primary test. As to the specimens, five out of 26 specimens had non-concordant results on the number of c-erbB-2 copies compared to the Her-2/chromosome-17-ratio.

Conclusion: A *systematic* review on the subject which compares FISH, CISH, IHC and their scoring systems is necessary. Furthermore the number of c-erbB-2-copies should be corrected by chromosome 17-copies when doing FISH. The lower limit of low-amplified tumours; when counting the number of c-erbB-2 copies; should perhaps be increased from 4 signals to 5 or 6 signals pr cell.

Innledning

2609 mennesker i Norge ble i år 2001 rammet av brystkreft(1). I tidsrommet 1992-96 var 5-års-overlevelsen totalt på ca 80 % (2). Av vesentlig betydning for forløpet er en korrekt og presis diagnose(3;4). Det har i Norge i flere år vært anbefalt å screene pasienter med invasive brystcarcinomer for forekomst av østrogen- og progesteron-reseptor i deres neoplasmer, da dette har betydning for prognose og eventuell iverksettelse av medikamentell terapi med Tamoxifen®(5). Analogt med dette er det i Norge nå anbefalt å teste alle invasive brystkarsinomer for overekspresjon/amplifikasjon av Her-2/c-erbB-2(6).

C-erbB-2-genet ble isolert i 1985/86(7-9). Genet ligger på kromosom 17q23 og koder for et 185kd transmembranprotein, Her-2, i HER-familien(10-12). Amplifikasjon/overekspresjon foreligger i 10-38% av humane brystkrefttilfeller(13-52). Det er vist at amplifikasjon av c-erbB-2 og overekspresjon av Her-2 er assosiert med dårligere prognose hos glandelpositive(13-16;18;19;21;24;53-56) og muligens også hos glandelnegative pasienter(14;16;24;53;57;58).

Her-2 har også vist seg å være angrepspunkt for medikamentell terapi med stoffet trastuzumab (Herceptin®), som er et humanisert monoklonalt antistoff mot reseptoren.(59-62). Videre er det mulig at overekspresjon/genamplifikasjon av Her-2/c-erbB-2 kan si noe om respons for hormonell terapi(25;54;63-66) samt andre typer medikamentell terapi(22;67-71;71;72).

Det er diskusjon om hvorvidt immunhistokjemi(IHC) eller in situ hybridisering(ISH) bør være førstevalg for kvantifisering av Her-2/c-erbB-2.(73-77) To hovedsyn forfektes: Enkelte mener at IHC bør være førstevalg og at ISH brukes i tilfeller hvor IHC: +2(78-80). Andre mener at ISH bør være førstevalg, da denne er mer sensitiv og spesifikk enn IHC(81;82).

Det finnes hovedsakelig to ulike ”kits” til bruk ved ISH for deteksjon av genamplifikasjon. Forskjellen ligger i at det ene kun merker for genet (c-erbB-2), mens det andre også merker for kromosom 17. Sistnevnte for å skille lavgenamplifikasjon fra polysomi ved fra mer enn 2 til og med 4 signaler for c-erbB-2 pr celle(83). Å skulle merke for både gen og kromosom er imidlertid en mer tidkrevende, og ergo mer kostbar, prosedyre(79).

Oppgaven tar for seg hvorvidt det foreligger lavgenamplifikasjon eller polysomi ved mer enn 2, men 4 eller færre signaler ved ISH kun med probe for genet. Videre vurderes om IHC eller ISH bør være førstevalg ved påvisning av Her-2/c-erbB-2 ved invasive brystcarcinomer.

C-erbB-2/Her-2 og invasiv brystkreft: In situ hybridisering bør foretrekkes fremfor immunhistokjemi for å påvise amplifikasjon/overekspresjon

Det finnes en rekke ulike metoder for å påvise enten overekspresjon av Her-2 eller genamplifikasjon av c-erbB-2. Man skiller mellom genbaserte og proteinbaserte metoder. Blant de genbaserte finnes CISH, FISH, Southern blotting, slot blot, PCR-baserte. Blant de proteinbaserte finnes IHC, Western blot og ELISA. Av metodene er ISH og IHC de mest brukte og mest aktuelle å bruke innen patologisk-anatomisk diagnostikk(84-86).

I denne studien forsøkte man å gi en enkel oversikt over hva forskningen sier om hvorvidt IHC eller ISH bør brukes ved brystkreft for påvisning av respektivt overekspresjon eller amplifikasjon av Her-2/c-erbB-2.

Metode

Et søk i databasene Cochrane og Pubmed ble gjort 26/8-05. I Cochrane brukte man søkeordene ish, fish, in situ hybridization, cish kombinert med OR, erbB-2, erbB2, genes erbB-2, c-erb-b2, c-erbb-2, her-2, her2 og neu kombinert med OR, breast neoplasms, breast cancer, breastcancer, cancer mammae, cancer mamma, breast carcinoma kombinert med OR. Disse søkene ble så kombinert med AND. Man fikk ingen treff på systematiske oversikter. I Pubmed brukte man samme søkeord kombinert på samme måte og begrenset til Reviews, engelsk språk. Man fikk da 64 treff.

Ekskludert ble artikler som, etter gjennomgang av tittel eller abstrakt, i liten grad så ut til å omhandle emnet. Disse omhandlet primært: andre neoplasmer(7), brystkreft mer generelt(6), prognose og prediksjonsverdi(3), nasjonale retningslinjer(2) og kliniske problemstillinger(14). I tillegg ble artikler som verken fantes på Bibliotek for medisin- og helsefag, biblioteket ved UUS eller på deres felles liste over elektroniske tidsskrifter(17) ekskludert. Det stod da igjen 15 artikler. En av disse viste seg å være en studie om kvalitetssikring av laboratorier. En annen var en primærstudie. Disse to ble ekskludert.

Tabell 1: Inkluderte studier

Studie:	År:	Resultat*:
Ross et al(87)	1999	IHC eller FISH på frysensnitt eller ELISA på tumorcytosol
Van de Vijver MJ(88)	2001	IHC, deretter FISH el. PCR ved 2+
Schaller et al(89)	2001	Kombinere IHC og FISH; ikke nærmere angitt
Mokbel K, Hassanaly D(90)	2001	IHC under standardiserte betingelser, evt. kun FISH
Schnitt SJ, Jacobs TW(78)	2001	IHC m/ tillegg av FISH ved +1 el +2

Studie:	År:	Resultat*:
Hayes DF, Thor AD(91)	2002	Ikke nærmere angitt
Rampaul et al(92)	2002	IHC
Bartlett et al(84)	2003	IHC m/streng kvalitetssikring
Ross et al(83)	2003	FISH
Ross et al(93)	2003	Ikke nærmere angitt
Perez et al(94)	2004	IHC, FISH ved +2
Lewis et al(95)	2004	IHC, FISH ved +2
Hicks et al(96)	2005	FISH

**Resultat sier noe om hvilken metode artikkelforfatterne anser for å være den beste til å påvise overekspresjon/genamplifikasjon av Her-2/c-erbB-2*

En gjennomgang av artiklene viser at ingen av dem er systematiske oversikter. De fleste er oversiktsartikler, mens en, Schnitt SJ og Jacobs TW, er en kommentar. Ingen inneholder oversikt over inkluderte artikler, søkestrategi eller inklusjons-/eksklusjonskriterier. Formålet er definert i 4 av studiene(83;84;87;92).

Resultater

IHC og FISH har en rekke fordeler i forhold til andre metoder som har vært i bruk for påvisning av Her-2(tabell 2). De utføres på snitt, bevarer vevsarkitektur og gir således mulighet for å skille normalt fra patologisk vev(84;88;92). Man unngår også fortynningseffekter av vev som man kan se ved f. eks ELISA(92). Videre gir de mulighet for semikvantitativ/kvantitativ bestemmelse av Her-2/c-erbB-2(83). Metodene skiller seg imidlertid også fra hverandre på en del områder. Forskjellene vil bli gjennomgått nedenfor.

Tabell 2: Sammenlikning av metoder for deteksjon av abnormaliteter ved Her-2/c-erbB-2, modifisert fra Rampaul et al(92) og Ross JS og Fletcher JA(87)

Metode	IHC, frosset vev	IHC, parafinfixert vev	ELISA	Southern blot	FISH
Avdekket abnormalitet	Protein-overekspresjon	Protein-overekspresjon	Protein-overekspresjon	Gen	Gen
På snitt	Ja	Ja	Nei	Nei	Ja
Affisert av lagring	Nei	Ja	Nei	Nei	Ja
Affisert av fortynning av mål-molekylet	Nei	Nei	Ja	Ja	Nei
Kan utføres på tumores <1cm	Vanskelig	Ja	Nei	Nei	Ja

Metode	IHC, frosset vev	IHC, parafinfixert vev	ELISA	Southern blot	FISH
Standardisert teknikk	Nei	Nei	Nei	Nei	Ja
Kan gjøres på nålebiopsier og FNAer	Nei	Ja	Nei	Nei	Ja
Sensitivitet	Høy	God	Høy	God	Høy
Spesifisitet	Høy	God	Høy	Høy	Høy

IHC er en ustandardisert prosedyre både i forhold til hvordan den skal scores og i forhold til tekniske aspekter(83;87;92). Interscorer-uenighet er et problem(97), og reproduserbarheten mellom laboratorier er varierende(98-100). Et annet moment har vært hvorvidt cytoplasmatisk fargning har betydning for prognose og forekomst av overekspresjon. Her har det vært gjort motstridende funn(101;102).

Ved IHC varierer fargningen med fiksasjonen, og man får best resultat ved bruk av frosset vev(103). Metoden er følsom for lagring(104;105). Dessuten vil ulike antistoffer i bruk farge ulikt og ha ulik sensitivitet(106-109). Varierende antigen-retrieval teknikker og deteksjonsteknikker kan og være kilder til ulike fargninger(83;87-89).

Det har vært forsøkt å omgå disse problemene ved å enes om en test med standardiserte betingelser og scoring. Herceptest®(DAKO) er en slik, der man ved å studere cellelinjer i tillegg har kunnet lage semikvantitative mål for ekspresjonen(83). Imidlertid er det fortsatt usikkerhet rundt testens sensitivitet og reproduserbarhet mellom ulike laboratorier(79;81;110-116).

En relativt ny tilnærming har vært å nytte automatiserte avlesningsmetoder, men selv om disse har vist seg å være mer objektive enn manuell avlesning, kan de i liten grad ta høyde for ulikheter i fiksasjon, vevsprosessering, antigen retrieval og ekspresjon av signalet(84;117;118).

ISH er enklere å kvantitere og har under 10 % interscorer-uenighet(79;119). Reproduserbarheten mellom laboratorier ligger på 97 % i følge studien til Paik et al(120). Videre har man ved ISH en intern kontroll i form av signalene fra normale celler(83). DNA er mer stabilt enn protein og derfor mindre sårbart for variasjoner i vevsfixering og prosessering(78;89). ISH har også vist seg å være mer presis enn IHC; den markerer for det den skal markere - nemlig overekspresjon av Her-2, og har en sensitivitet og spesifisitet på mellom 90-100% (121-123).

Det er betydelig vanskeligere å lagre FISH-snitt enn IHC-snitt, men dette kan endres ved bruk av CISH-teknikken(83). Dessuten krever FISH, i motsetning til IHC og CISH, spesialmikroskop(83;89). CISH har vist relativt god konkordans med FISH (84-100 %) (124-131).

Vel så viktig som reproduserbarhet, spesifisitet, sensitivitet og presisjon er samsvaret mellom svaret vi får ved bruk av metoden og de utfallene vi ønsker å si noe om. For

Her-2-testingens vedkommende vil dette først og fremst dreie seg om prognose og effekt av Herceptin © -behandling. Studier viser at ISH er en bedre indikator enn IHC for effekt av Herceptin © -behandling (132-135). Imidlertid er en av disse studiene beheftet med svakheter, da den er retrospektiv og ingen IHCnegative/FISHpositive er inkludert.

På den biokjemiske siden er det interessant å merke seg at Tubbs et al i sin studie påviste at tumores som var positive ved IHC og negative ved FISH ikke hadde økt innhold av RNA for Her-2. IHC-positiviteten representerer derfor mest sannsynlig en svakhet ved metoden og er ikke uttrykk for en virkelig overekspresjon(79). Dette i motsetning til hypotesen om at disse tumorene kunne ha en transkripsjonell oppregulering av c-erbB-2(136).

To metaanalyser viser at ISH er en bedre indikator når det gjelder prognose(83;137). En enkeltstudie viser at prognosen til IHCpositive/FISHnegative tilsvarer prognosen til de som er negative ved begge metoder(81).

Når det gjelder de økonomiske aspektene har IHC et fortrinn da metoden er billigere og mindre tidkrevende(85). Fornier et al viser dog at FISH er mer kostnadseffektiv som indikasjon for Herceptin®-behandling(138).

Diskusjon

De metodiske svakhetene innebærer at en i liten grad kan trekke vitenskaplig gyldige slutninger ut fra de resultater oversiktsartiklene presenterer. Når det, trass i dette, ble tatt utgangspunkt i disse artiklene, skyldes det at tiden en hadde til disposisjon ikke var tilstrekkelig for en gjennomgang av det omfattende tilfanget av primærstudier.

Konklusjon

Det foregår en diskusjon om hvorvidt ISH eller IHC bør være førstevalg ved påvisning av genamplifikasjon/overekspresjon av c-erbB-2/Her-2. IHCs fordeler er først og fremst at det er en rask, rimelig og enkel undersøkelse som er veletablert i de fleste patologiske laboratorier. Imidlertid er den beheftet med en del problemer både i forhold til scoring og tekniske aspekter.

Dette er mindre uttalt ved FISH, og de tekniske aspektene kanskje enda mindre med CISH. FISH har bedre sensitivitet, spesifisitet, presisjon og er en bedre indikator på prognose og Herceptin®-behandling enn IHC. FISH er imidlertid mer komplisert teknisk, krever mer tid og koster mer.

Konkordansen mellom IHC og FISH er stort sett god, spesielt ved IHC-signal på +0,+1,+3.(85;99) Denne bedres når IHC-prosedyren er standardisert Grunnet dette har det vært foreslått å bruke IHC som en førstescreening og la de som er +2 gå videre til ISH. Dog viser studier at man i +1-gruppen kan se enkelte tilfeller som er amplifiserte og i +3-gruppen se tilfeller som ikke er amplifiserte(82;139). FISH viser bedre sammenheng mellom positiv test og terapierespons på Herceptin® enn IHC. Man risikerer derfor ved å bruke IHC å behandle mennesker, med fare for medfølgende kardiotoksisitet, som ikke skulle vært behandlet, samtidig som man nekter enkelte som kunne hatt nytte av det behandling(60).

Med begrunnelse i mitt arbeid mener jeg at FISH bør være førstevalg for påvisning av Her-2. Dette med forbehold om at denne oppgaven tar utgangspunkt i artikler hvis kunnskapsgrunnlag er vanskelig å vurdere. Derfor kan man ikke være sikker på at den mest relevante kunnskap rundt emnet er kommet frem.

Antallet artikler tatt i betraktning er det nesten en umulig oppgave å lage en systematisk oversikt over emnet. For å få et endelig svar på om ISH eller IHC er mest egnet til å påvise amplifikasjon/overekspresjon av c-erbB-2/Her-2, eller for å kunne si noe om hva slags studier som trengs fremover, bør en slik oversikt lages.

In situ hybridisering for c-erbB-2 ved invasiv brystkreft: Korrigering for kromosom 17 er nødvendig

Hensikten var å undersøke hvorvidt det forelå polysomi eller genamplifikasjon ved fra 2 til og med 4 signaler med probe kun for c-erbB-2 ved ISH ved brystcarcinomer. Dette ut fra hypotesen om at det ved fra 2 til og med 4 signaler oftest ikke er tale om egentlig amplifikasjon, men polysomi av kromosom 17. Dette kan være avgjørende for hvorvidt det er nødvendig å teste med probe for både kromosom 17 og c-erbB-2, som hevdet av blant andre Paik et al.(53;140), eller om man kun trenger å teste for c-erbB-2, som hevdet av blant andre Jimenez et al og Wang et al(136;141). Å kun teste for c-erbB-2 vil være en billigere og mer tidsbesparende metode(79).

Metode

26 biopsier ble analysert. Alle var infiltrerende duktale carcinomer. Forøvrig heterogent materiale både med tanke på affeksjon av lymfeknuter og andre organmanifestasjoner. Alle var pasienter som skulle ha adjuvant behandling, dvs. det var ingen grad 1 svulster. Biopsiene ble undersøkt for Her-2/c-erbB-2 status ved patologisk anatomisk avdeling ved Ullevål universitetssykehus i tiden 1996 til 2003. Alle var fra kvinner. Snittalder på 47(31-64)år.

Alt materiale var i form av formalinfikserte biopsier innstøpt i parafin, og det ble gjort CISH for kromosom 17. For metode: se tabell 3.

Tabell 3: CISH av isolerte kjerner

1. Vask i destillert vann i 5 minutter.
2. Inkuber i 0,05M HCl i 10 minutter.
3. Vask i PBS (phosphatebuffer-saline) i 10 minutter.
4. Vask i 5 minutter i PBS/Tween20.
5. Vask i PBS i 5 minutter.
6. Dekondenser (fjerner histoner) med 1M NaSCN i 80 °C i 10 minutter.
7. Vask i 2x SSC(saline sodumcitrate) i romtemperatur.
8. Denaturer i 5 minutter med 70 % formamid/2x SSC pH 7,0 i 74 °C.
9. Dehydrer i -20 °C med 70 %, 80 %, og 100 % alkohol.
10. Proteinase K: 10µg/mL i 10 minutter i 37 °C.
11. Vask i PBS, dehydrer i romtemperatur og tørk.
12. Denaturer probe i 5 minutter i 70 °C i vannbad. La stå i is inntil bruk.
13. Legg probe og dekkglass på snittet, lim med gummisement.
14. Inkuber snittene i tett fuktkammer i 37-42 °C over natten.

15. Sett snittene i 2xSSC i 10 minutter i 37 °C og fjern forsiktig gummisement og dekkglass.
16. Ettervask i vannbad med 0,2xSSC i 5 minutter ved 70 °C
17. Vask i PBS/0,03 % Tween20 i 5 minutter

Deteksjon

18. Vask i PBS i 1 minutt
19. Inkuber med mus anti-biotin (1:50) i ca 2 timer
20. Vask i PBS/Tween20 i 10 minutter
21. Skyll i PBS
22. Inkuber med biotinylert hest anti-mus i 30 minutter
23. Vask med PBS/Tween20 i 10 minutter
24. Skyll i PBS
25. Inkuber med avidin-biotinperoxidase complex-reagens i 1 time
26. Vask med PBS/Tween20 i 10 minutter
27. Skyll i PBS
28. Inkuber med DAB i seks minutter
29. Skyll godt i destillert vann
30. Kontrastfarg med hematoxylin i 5 sekunder.
31. La stå i rennende vann i 10 minutter
32. Dehydrer og sett på dekkglass

I hvert preparat ble det telt 40 celler etter retningslinjer fra Persons et al(142). For en av biopsiene ble det laget to preparater. Dette tjente som intern kontroll. Det ble for disse preparatene benyttet et samlet gjennomsnittlig antall signaler pr celle. Undersøker (KM) var ikke kjent med pasientdata eller resultater fra tidligere undersøkelser på pasientene før kromosomsignalene ble talt.

Fra tidligere hadde en erfaren patolog analysert biopsiene for genekspresjon ved IHC og for c-erbB-2 ved FISH. For metode; se tabell 4

Tabell 4: FISH av isolerte kjerner

Punkt 1-17: se tabell 3

Deteksjon

18. Sett til FITC-merket avidin og inkuber ved 37 °C i 15 minutter i mørkt fuktkammer
19. Rens med PBS/0,03 % Tween20 3 ganger à 2 minutter

Motfargning

20. Tilsett DPI/Antifade og leg på dekkglass
21. Lagre ved -20 °C eller begynn å mikroskopere umiddelbart.

Biopsiene ble etter mikroskopi delt inn i fire grupper: Negative (fra og med 0 til og med 2 c-erbB-2 signaler), borderline/usikre (fra 2 til og med 4 signaler), amplifiserte (fra 4 til og med 6 signaler) og høyamplifiserte (over 6 signaler).

Man delte tallene for gjennomsnittlig antall signaler for c-erbB-2 pr celle i et preparat på gjennomsnittlig antall signaler pr celle for kromosom 17 fra samme biopsi. Dette

ble uttrykt som c-erbB-2/kromosom-17-ratioen. Ratio over 2 ble definert som amplifikasjon.

Aneusomi ble definert ut fra studien til Wang et al hvor disomi ble definert fra 1,76-2,25 signaler pr celle(141). Dette fordi en tumor som hovedsakelig er disom for kromosom 17 fortsatt kan avvike noe fra gjennomsnittlig to signaler pr celle grunnet tumorens genetiske instabilitet, høy mitotisk indeks og kjerneavskalling(141). Dessuten ble dette valgt for å gjøre det enklere å sammenligne med andre studier.

Resultater

Tabell 5: Oversikt over 26 preparater med invasiv brystkreft

IHC:	c-erbB-2:	Kromosom 17:	c-erbB-2/krom 17-ratio:	Samsvar*:
Neg	Neg	2,55	0,78	Ja
Neg	Neg	2,90	0,69	Ja
Neg	Neg	3,00	0,67	Ja
1+	2,3	2,53	0,91	Ja
1+	2,55	2,15	1,19	Ja
1+	2,7	3,15	0,86	Ja
Neg	2,7	2,80	0,96	Ja
1+	2,8	1,90	1,47	Ja
2+	2,8	2,05	1,37	Ja
2+	3	2,13	1,41	Ja
1+	3,2	2,00	1,60	Ja
2+	3,6	2,68	1,35	Ja
Neg	4	1,78	2,25	Nei
3+	4,2	2,98	1,41	Nei
2+	4,25	2,75	1,55	Nei
3+	4,4	2,58	1,71	Nei
2+	4,7	2,65	1,77	Nei
2+	5 til over20	2,40	2,08	Ja
2+	5,6	2,00	2,8	Ja

IHC:	c-erbB-2:	Kromosom 17:	c-erbB-2/krom 17-ratio:	Samsvar*:
2+	over 6	2,45	2,45	Ja
2+	6	2,73	2,20	Ja
Neg	høyampl.	1,88	3,19	Ja
2+	over 8	2,48	3,23	Ja
2+	over 8	3,23	2,48	Ja
2+	over 10	1,98	5,05	Ja
1+	over 10	1,90	5,26	Ja

*:dvs. at man får samme resultat vedr. hvorvidt preparatet er amplifisert eller ikke både ved absolutt antall c-erbB-2-kopier og c-erbB-2/kromosom 17-ratio.

For 21 av de 26 preparatene var det samsvar mellom absolutt antall c-erbB-2-kopier og c-erbB-2/kromosom 17-ratio. Av disse var 3 negative, 9 borderline(2,3-3,6 signaler), 2 amplifiserte(5,6 og 6 signaler) og 7 høyamplifiserte(antall signaler ikke nærmere angitt).

Av de fem preparatene hvor det ikke var samsvar var 4 amplifiserte (4,2-4,7 signaler), og ett borderline (4 signaler). 4 av preparatene uten samsvar var positive ved absolutt antall c-erbB-2 kopier og negative med c-erbB-2/kromosom 17-ratio. Disse var alle polysome (kromosom 17>2,25). Ett var positivt ved c-erbB-2/kromosom 17- ratio og negativt ved absolutt antall c-erbB-2 kopier.

16 (62 %) av preparatene var polysome for kromosom 17. Dette er i overensstemmelse med data fra andre studier(141;143;144). Det var ingen klar sammenheng mellom antall kopier av kromosom 17 og antall c-erbB-2-kopier. Dette er også funnet av Wang et al(141). Av preparater med fra 2 til og med 4 c-erbB-2-signalere var 4 av 9 polysome. De øvrige var disome.

Diskusjon

Det var samsvar for 21 av 26 preparater. Dette viser at det ikke er likegyldig om man korregerer for antall kopier av kromosom 17. Imidlertid er det mange flere ikke-samsvarende her 5(19 %) enn i andre undersøkelser (0-10 %)(53;79;121;141;145-147). Dette skyldes seleksjon av materialet til denne studien.

Når det gjelder fordelingen av de ikke-samsvarende mellom grupper, var materialet i tråd med andre publiserte materialer: Antall ikke-samsvarende som er positive ved c-erbB-2/kromosom 17-ratio var her på 20 % av de ikke-samsvarende. Dette har vært observert til 0-17 % i andre studier(121;141;145-147).

Gjennomsnittlig antall kromosom 17 i preparatet, som var positivt ved c-erbB-2/kromosom 17-ratio og negativt ved absolutt antall c-erbB-2-kopier, er 1,78 (KI 95 %:1,22-2,33). Dette er på grensen mot hyposomi ($\leq 1,75$ signaler). Videre er preparatet også på grensen til å være amplifisert. Lal et al fant at preparater som ligger i grenselandet for amplifisering ved c-erbB-2/kromosom-17-ratio(1,7-2,5) er de som oftest får diskrepante resultater ved de to ulike metodene(148). Dette skyldes

hyposomi. Wang et al hevder i sin artikkel at absolutt antall c-erbB-2-kopier kan være et bedre mål enn c-erbB-2/kromosom 17-ratio ved hyposomi(141).

Videre er det hovedsaklig i gruppen med amplifiserte at det er forskjeller mellom metodene. 4 av 5 preparater uten samsvar er i denne gruppen. Det ene borderline uten samsvar har dessuten akkurat 4 c-erbB-2 signaler slik at det er mulig at dette også egentlig var amplifisert. (Konfidensintervall for denne verdien var ikke tilgjengelig for forfatter)

Interessant er det å merke seg at de c-erbB-2-signalverdier det ikke er samsvar for ligger på et kontinuum fra 4 til 4,7. Dette er i samsvar med hva Vera-Román et al fant i sin undersøkelse av 50 infiltrerende brystcarcinomer. Her var 3 preparater positive ved absolutt antall c-erbB-2-kopier og negative ved c-erbB-2/kromosom 17-ratio. Disse hadde 5,1-5,8 c-erbB-2-signaler(146). Dermed vil en heving av grensen for positivitet fra 4 til 6 gi fullt samsvar i Vera-Románs undersøkelse. I mitt materiale ville en slik grenseheving ikke behøve å gå høyere enn 5,6 da jeg har samsvar for preparater over denne verdien. Imidlertid kan det se ut til at en høyere cut-off verdi enn 4 kunne gi bedre samsvar mellom metodene.

Noe av begrunnelsen for å sette grensen til 4 signaler ved absolutt c-erbB-2-ratio kan være at det i normale celler kan være inntil 4 genkopier i en normal celle under mitosen samt at en del svulster kan ha en distinkt populasjon av tetraploide celler uten at det foreligger aneusomi. En slik ratio tar imidlertid ikke høyde for polysomi av kromosom 17, som forekommer i ca 50 % av tilfellene med invasiv brystkreft som kommer til testing for her-2/c-erbB-2-status(141;143;144). For brystcarsinomer generelt forekommer polysomi i ca 30 % av tilfellene(149).

Det vesentligste for å avgjøre hvilken metode som skal foretrekkes er det kliniske korrelatet. De fleste undersøkelser på Herceptin®-respons har vært gjort ut fra c-erbB-2/kromosom 17-ratio. Det har ikke vært gjort studier der man i særlig grad har sammenlignet de to metodenes evne til å forutsi respons på Herceptin®-terapi. C-erbB-2/kromosom 17-ratio har dog, i én studie, vist seg å ha bedre positiv prediktiv verdi enn absolutt antall c-erbB-2-kopier(121).

Watters et al mener at man bør teste for kromosom 17; ikke bare ut fra dens rolle som korrigering for aneusomi ved c-erbB-2-amplifisering, men også fordi den ved univariat analyse har vist seg å predikere en dårligere prognose(143;150-152). Studiene har imidlertid vært relativt små (16-71 kasus). Watters et al kunne heller ikke reprodusere dette funnet i sin studie, og forfatter har ikke kunnet finne i litteraturen at kromosom 17 ved multivariat analyse skulle predikere dårligere prognose.

Når det gjelder IHC, ser man det er samsvar mellom dette(negative, 1+ og 2+) og de andre metodene for alle non- og borderline preparater, hvor det er samsvar mellom absolutt antall c-erbB-2-kopier og c-erbB-2/kromosom 17-ratio. For preparatet uten samsvar mellom c-erbB-2 signaler og c-erbB-2/kromosom-17-ratio viser IHC samsvar med c-erbB-2-signaler. For de amplifiserte og høyamplifiserte er det vanskelig å finne noe mønster mellom IHC og ISH.

Konklusjon

Man bør fortsatt bruke c-erbB-2/kromosom 17-ratio for å avgjøre om et preparat er amplifisert for c-erbB-2. Dette da de fleste studier på trastuzumab er gjort med en slik ratio og samsvaret mellom absolutt antall c-erbB-2-kopier og c-erbB-2/kromosom 17-ratio ikke er tilfredsstillende. Imidlertid kan det være grunn til også å vurdere absolutt antall c-erbB-2-signaler i hyposome preparater.

Å heve den etablerte øvre grensen for borderline ved bruk av c-erbB-2-signaler fra 4 til 5, ut fra denne studien og studien til Vera-Roman et al, vil være prematurt. Med kun fire preparater til sammen er tallene små. Dessuten ser heller ikke dette ut til å gi fullstendig samsvar. Å heve grensen kan imidlertid vurderes dersom større studier utført av mer erfarne undersøkere understøtter dette.

Selv om det ikke var studiens mål å undersøke IHC-resultater i forhold til ISH-resultatene, er det interessant å merke seg følgende: Man finner 2 med 3+ i de som var non-amplifisert ved bruk av c-erbB-2/kromosom 17-ratio og en med 1+ som var amplifisert ved c-erbB-2/kromosom 17-ratio. Om en bruker de vanlige kriteriene, med at kun de med 2+ ved IHC testes med ISH, ville her én pasient ikke fått en sannsynlig nyttig behandling, mens to som sannsynlig ikke ville hatt nytte av det ville blitt utsatt for en unødvendig behandling med potensielt alvorlige bivirkninger.

Referanser

- (1) Krefregisteret.
<http://www.krefregisteret.no/ramme.htm?http://www.krefregisteret.no/fakta/kreft.htm> . 25-8-2005.
Ref Type: Electronic Citation
- (2) http://www.krefregisteret.no/frame.htm?http://www.krefregisteret.no/forekomst_og_overlevelse_2000/breast/survival.htm . 3-7-2004.
Ref Type: Electronic Citation
- (3) Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D, Thor AD, Allred DC, Clark GM et al. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. Arch Pathol Lab Med 2000; 124(7):966-978.
- (4) Johnstone PA, Norton MS, Riffenburgh RH. Survival of patients with untreated breast cancer. J Surg Oncol 2000; 73(4):273-277.
- (5) NorskBrystCancerGruppe.
<http://www.nbcbg.net/default.asp?page=40&id=11> . 5-7-2004.
Ref Type: Electronic Citation
- (6) NorskBrystCancerGruppe.
<http://www.nbcbg.net/default.asp?page=61> . 2004.
Ref Type: Electronic Citation
- (7) Downward J, Yarden Y, Mayes E, Scrace G, Totty N, Stockwell P et al. Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences. Nature 1984; 307(5951):521-527.
- (8) Padhy LC, Shih C, Cowing D, Finkelstein R, Weinberg RA. Identification of a phosphoprotein specifically induced by the transforming DNA of rat neuroblastomas. Cell 1982; 28(4):865-871.

- (9) Schechter AL, Stern DF, Vaidyanathan L, Decker SJ, Drebin JA, Greene MI et al. The neu oncogene: an erb-B-related gene encoding a 185,000-Mr tumour antigen. *Nature* 1984; 312(5994):513-516.
- (10) Tzahar E, Yarden Y. The ErbB-2/HER2 oncogenic receptor of adenocarcinomas: from orphanhood to multiple stromal ligands. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1377(1):M25-M37.
- (11) Slamon DJ, Clark GM. Amplification of c-erbB-2 and aggressive human breast tumors? *Science* 1988; 240(4860):1795-1798.
- (12) De Potter CR. The neu-oncogene: more than a prognostic indicator? *Hum Pathol* 1994; 25(12):1264-1268.
- (13) Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987; 235(4785):177-182.
- (14) Wright C, Angus B, Nicholson S, Sainsbury JR, Cairns J, Gullick WJ et al. Expression of c-erbB-2 oncoprotein: a prognostic indicator in human breast cancer. *Cancer Res* 1989; 49(8):2087-2090.
- (15) Borg A, Tandon AK, Sigurdsson H, Clark GM, Ferno M, Fuqua SA et al. HER-2/neu amplification predicts poor survival in node-positive breast cancer. *Cancer Res* 1990; 50(14):4332-4337.
- (16) Paik S, Hazan R, Fisher ER, Sass RE, Fisher B, Redmond C et al. Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project: prognostic significance of erbB-2 protein overexpression in primary breast cancer. *J Clin Oncol* 1990; 8(1):103-112.
- (17) Battifora H, Gaffey M, Esteban J, Mehta P, Bailey A, Faucett C et al. Immunohistochemical assay of neu/c-erbB-2 oncogene product in paraffin-embedded tissues in early breast cancer: retrospective follow-up study of 245 stage I and II cases. *Mod Pathol* 1991; 4(4):466-474.
- (18) Lovekin C, Ellis IO, Locker A, Robertson JF, Bell J, Nicholson R et al. c-erbB-2 oncoprotein expression in primary and advanced breast cancer. *Br J Cancer* 1991; 63(3):439-443.
- (19) Rilke F, Colnaghi MI, Cascinelli N, Andreola S, Baldini MT, Bufalino R et al. Prognostic significance of HER-2/neu expression in breast cancer and its relationship to other prognostic factors. *Int J Cancer* 1991; 49(1):44-49.
- (20) Allred DC, Clark GM, Tandon AK, Molina R, Tormey DC, Osborne CK et al. HER-2/neu in node-negative breast cancer: prognostic significance of overexpression influenced by the presence of in situ carcinoma. *J Clin Oncol* 1992; 10(4):599-605.
- (21) Gusterson BA, Gelber RD, Goldhirsch A, Price KN, Save-Soderborgh J, Anbazhagan R et al. Prognostic importance of c-erbB-2 expression in breast cancer. International (Ludwig) Breast Cancer Study Group. *J Clin Oncol* 1992; 10(7):1049-1056.
- (22) Muss HB, Thor AD, Berry DA, Kute T, Liu ET, Koerner F et al. c-erbB-2 expression and response to adjuvant therapy in women with node-positive early breast cancer. *N Engl J Med* 1994; 330(18):1260-1266.
- (23) Tetu B, Brisson J. Prognostic significance of HER-2/neu oncoprotein expression in node-positive breast cancer. The influence of the pattern of immunostaining and adjuvant therapy. *Cancer* 1994; 73(9):2359-2365.

- (24) Andrulis IL, Bull SB, Blackstein ME, Sutherland D, Mak C, Sidlofsky S et al. neu/erbB-2 amplification identifies a poor-prognosis group of women with node-negative breast cancer. Toronto Breast Cancer Study Group. *J Clin Oncol* 1998; 16(4):1340-1349.
- (25) Sjogren S, Ingnas M, Lindgren A, Holmberg L, Bergh J. Prognostic and predictive value of c-erbB-2 overexpression in primary breast cancer, alone and in combination with other prognostic markers. *J Clin Oncol* 1998; 16(2):462-469.
- (26) van de Vijver MJ, Peterse JL, Mooi WJ, Wisman P, Lomans J, Dalesio O et al. Neu-protein overexpression in breast cancer. Association with comedo-type ductal carcinoma in situ and limited prognostic value in stage II breast cancer. *N Engl J Med* 1988; 319(19):1239-1245.
- (27) Heintz NH, Leslie KO, Rogers LA, Howard PL. Amplification of the c-erb B-2 oncogene and prognosis of breast adenocarcinoma. *Arch Pathol Lab Med* 1990; 114(2):160-163.
- (28) Berger MS, Locher GW, Saurer S, Gullick WJ, Waterfield MD, Groner B et al. Correlation of c-erbB-2 gene amplification and protein expression in human breast carcinoma with nodal status and nuclear grading. *Cancer Res* 1988; 48(5):1238-1243.
- (29) Tsuda H, Hirohashi S, Shimosato Y, Hirota T, Tsugane S, Watanabe S et al. Correlation between histologic grade of malignancy and copy number of c-erbB-2 gene in breast carcinoma. A retrospective analysis of 176 cases. *Cancer* 1990; 65(8):1794-1800.
- (30) Kallioniemi OP, Holli K, Visakorpi T, Koivula T, Helin HH, Isola JJ. Association of c-erbB-2 protein overexpression with high rate of cell proliferation, increased risk of visceral metastasis and poor long-term survival in breast cancer. *Int J Cancer* 1991; 49(5):650-655.
- (31) Gullick WJ, Love SB, Wright C, Barnes DM, Gusterson B, Harris AL et al. c-erbB-2 protein overexpression in breast cancer is a risk factor in patients with involved and uninvolved lymph nodes. *Br J Cancer* 1991; 63(3):434-438.
- (32) Clark GM, McGuire WL. Follow-up study of HER-2/neu amplification in primary breast cancer. *Cancer Res* 1991; 51(3):944-948.
- (33) McCann AH, Dervan PA, O'Regan M, Codd MB, Gullick WJ, Tobin BM et al. Prognostic significance of c-erbB-2 and estrogen receptor status in human breast cancer. *Cancer Res* 1991; 51(12):3296-3303.
- (34) Winstanley J, Cooke T, Murray GD, Platt-Higgins A, George WD, Holt S et al. The long term prognostic significance of c-erbB-2 in primary breast cancer. *Br J Cancer* 1991; 63(3):447-450.
- (35) O'Reilly SM, Barnes DM, Camplejohn RS, Bartkova J, Gregory WM, Richards MA. The relationship between c-erbB-2 expression, S-phase fraction and prognosis in breast cancer. *Br J Cancer* 1991; 63(3):444-446.
- (36) Paterson MC, Dietrich KD, Danyluk J, Paterson AH, Lees AW, Jamil N et al. Correlation between c-erbB-2 amplification and risk of recurrent disease in node-negative breast cancer. *Cancer Res* 1991; 51(2):556-567.
- (37) Toikkanen S, Helin H, Isola J, Joensuu H. Prognostic significance of HER-2 oncoprotein expression in breast cancer: a 30-year follow-up. *J Clin Oncol* 1992; 10(7):1044-1048.
- (38) Molina R, Ciocca DR, Tandon AK, Allred DC, Clark GM, Chamness GC et al. Expression of HER-2/neu oncoprotein in human breast cancer: a comparison of immunohistochemical and western blot techniques. *Anticancer Res* 1992; 12(6B):1965-1971.

- (39) Noguchi M, Koyasaki N, Ohta N, Kitagawa H, Earashi M, Thomas M et al. C-erbB-2 oncoprotein expression versus internal mammary lymph node metastases as additional prognostic factors in patients with axillary lymph node-positive breast cancer. *Cancer* 1992; 69(12):2953-2960.
- (40) Babiak J, Hugh J, Poppema S. Significance of c-erbB-2 amplification and DNA aneuploidy. Analysis in 78 patients with node-negative breast cancer. *Cancer* 1992; 70(4):770-776.
- (41) Tiwari RK, Borgen PI, Wong GY, Cordon-Cardo C, Osborne MP. HER-2/neu amplification and overexpression in primary human breast cancer is associated with early metastasis. *Anticancer Res* 1992; 12(2):419-425.
- (42) Bianchi S, Paglierani M, Zampi G, Cardona G, Cataliotti L, Bonardi R et al. Prognostic significance of c-erbB-2 expression in node negative breast cancer. *Br J Cancer* 1993; 67(3):625-629.
- (43) Press MF, Pike MC, Chazin VR, Hung G, Udove JA, Markowicz M et al. Her-2/neu expression in node-negative breast cancer: direct tissue quantitation by computerized image analysis and association of overexpression with increased risk of recurrent disease. *Cancer Res* 1993; 53(20):4960-4970.
- (44) Seshadri R, Figgairi FA, Horsfall DJ, McCaul K, Setlur V, Kitchen P. Clinical significance of HER-2/neu oncogene amplification in primary breast cancer. The South Australian Breast Cancer Study Group. *J Clin Oncol* 1993; 11(10):1936-1942.
- (45) Descotes F, Pavy JJ, Adessi GL. Human breast cancer: correlation study between HER-2/neu amplification and prognostic factors in an unselected population. *Anticancer Res* 1993; 13(1):119-124.
- (46) Hartmann LC, Ingle JN, Wold LE, Farr GH, Jr., Grill JP, Su JQ et al. Prognostic value of c-erbB2 overexpression in axillary lymph node positive breast cancer. Results from a randomized adjuvant treatment protocol. *Cancer* 1994; 74(11):2956-2963.
- (47) Jacquemier J, Penault-Llorca F, Viens P, Houvenaeghel G, Hassoun J, Torrente M et al. Breast cancer response to adjuvant chemotherapy in correlation with erbB2 and p53 expression. *Anticancer Res* 1994; 14(6B):2773-2778.
- (48) Marks JR, Humphrey PA, Wu K, Berry D, Bandarenko N, Kerns BJ et al. Overexpression of p53 and HER-2/neu proteins as prognostic markers in early stage breast cancer. *Ann Surg* 1994; 219(4):332-341.
- (49) Quenel N, Wafflart J, Bonichon F, de M, I, Trojani M, Durand M et al. The prognostic value of c-erbB2 in primary breast carcinomas: a study on 942 cases. *Breast Cancer Res Treat* 1995; 35(3):283-291.
- (50) O'Malley FP, Saad Z, Kerkvliet N, Doig G, Stitt L, Ainsworth P et al. The predictive power of semiquantitative immunohistochemical assessment of p53 and c-erb B-2 in lymph node-negative breast cancer. *Hum Pathol* 1996; 27(9):955-963.
- (51) Xing WR, Gilchrist KW, Harris CP, Samson W, Meisner LF. FISH detection of HER-2/neu oncogene amplification in early onset breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1996; 39(2):203-212.
- (52) Querzoli P, Albonico G, Ferretti S, Rinaldi R, Beccati D, Corcione S et al. Modulation of biomarkers in minimal breast carcinoma: a model for human breast carcinoma progression. *Cancer* 1998; 83(1):89-97.

- (53) Press MF, Bernstein L, Thomas PA, Meisner LF, Zhou JY, Ma Y et al. HER-2/neu gene amplification characterized by fluorescence in situ hybridization: poor prognosis in node-negative breast carcinomas. *J Clin Oncol* 1997; 15(8):2894-2904.
- (54) Jukkola A, Bloigu R, Soini Y, Savolainen ER, Holli K, Blanco G. c-erbB-2 positivity is a factor for poor prognosis in breast cancer and poor response to hormonal or chemotherapy treatment in advanced disease. *Eur J Cancer* 2001; 37(3):347-354.
- (55) Agrup M, Stal O, Olsen K, Wingren S. C-erbB-2 overexpression and survival in early onset breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2000; 63(1):23-29.
- (56) Cooke T, Reeves J, Lannigan A, Stanton P. The value of the human epidermal growth factor receptor-2 (HER2) as a prognostic marker. *Eur J Cancer* 2001; 37 Suppl 1:3-10.
- (57) Dati C, Muraca R, Tazartes O, Antoniotti S, Perroteau I, Giai M et al. c-erbB-2 and ras expression levels in breast cancer are correlated and show a co-operative association with unfavorable clinical outcome. *Int J Cancer* 1991; 47(6):833-838.
- (58) Borg A, Baldetorp B, Ferno M, Killander D, Olsson H, Ryden S et al. ERBB2 amplification is associated with tamoxifen resistance in steroid-receptor positive breast cancer. *Cancer Lett* 1994; 81(2):137-144.
- (59) Tedesco KL, Thor AD, Johnson DH, Shyr Y, Blum KA, Goldstein LJ et al. Docetaxel combined with trastuzumab is an active regimen in HER-2 3+ overexpressing and fluorescent in situ hybridization-positive metastatic breast cancer: a multi-institutional phase II trial. *J Clin Oncol* 2004; 22(6):1071-1077.
- (60) Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 2001; 344(11):783-792.
- (61) Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathy D, Robert NJ, Scholl S, Fehrenbacher L et al. Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J Clin Oncol* 1999; 17(9):2639-2648.
- (62) Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, Gutheil JC, Harris LN, Fehrenbacher L et al. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2002; 20(3):719-726.
- (63) Burke HB, Hoang A, Iglehart JD, Marks JR. Predicting response to adjuvant and radiation therapy in patients with early stage breast carcinoma. *Cancer* 1998; 82(5):874-877.
- (64) Ferrero-Pous M, Hacene K, Bouchet C, Le D, V, Tubiana-Hulin M, Spyrtos F. Relationship between c-erbB-2 and other tumor characteristics in breast cancer prognosis. *Clin Cancer Res* 2000; 6(12):4745-4754.
- (65) Pinto AE, Andre S, Pereira T, Nobrega S, Soares J. C-erbB-2 oncoprotein overexpression identifies a subgroup of estrogen receptor positive (ER+) breast cancer patients with poor prognosis. *Ann Oncol* 2001; 12(4):525-533.
- (66) Carlomagno C, Perrone F, Gallo C, De Laurentiis M, Lauria R, Morabito A et al. c-erb B2 overexpression decreases the benefit of adjuvant tamoxifen in early-stage breast cancer without axillary lymph node metastases. *J Clin Oncol* 1996; 14(10):2702-2708.

- (67) De Placido S, De Laurentiis M, Carlomagno C, Gallo C, Perrone F, Pepe S et al. Twenty-year results of the Naples GUN randomized trial: predictive factors of adjuvant tamoxifen efficacy in early breast cancer. *Clin Cancer Res* 2003; 9(3):1039-1046.
- (68) Giai M, Roagna R, Ponzzone R, De Bortoli M, Dati C, Sismondi P. Prognostic and predictive relevance of c-erbB-2 and ras expression in node positive and negative breast cancer. *Anticancer Res* 1994; 14(3B):1441-1450.
- (69) Berns EM, Foekens JA, van Staveren IL, van Putten WL, de Koning HY, Portengen H et al. Oncogene amplification and prognosis in breast cancer: relationship with systemic treatment. *Gene* 1995; 159(1):11-18.
- (70) Yu D, Liu B, Tan M, Li J, Wang SS, Hung MC. Overexpression of c-erbB-2/neu in breast cancer cells confers increased resistance to Taxol via mdr-1-independent mechanisms. *Oncogene* 1996; 13(6):1359-1365.
- (71) Di Leo A, Larsimont D, Gancberg D, Jarvinen T, Beauduin M, Vindevoghel A et al. HER-2 and topo-isomerase IIalpha as predictive markers in a population of node-positive breast cancer patients randomly treated with adjuvant CMF or epirubicin plus cyclophosphamide. *Ann Oncol* 2001; 12(8):1081-1089.
- (72) Petit T, Borel C, Ghnassia JP, Rodier JF, Escande A, Mors R et al. Chemotherapy response of breast cancer depends on HER-2 status and anthracycline dose intensity in the neoadjuvant setting. *Clin Cancer Res* 2001; 7(6):1577-1581.
- (73) Dowsett M, Cooke T, Ellis I, Gullick WJ, Gusterson B, Mallon E et al. Assessment of HER2 status in breast cancer: why, when and how? *Eur J Cancer* 2000; 36(2):170-176.
- (74) Nelson NJ. Experts debate value of HER2 testing methods. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92(4):292-294.
- (75) Hanna WM, Kahn HJ, Pienkowska M, Blondal J, Seth A, Marks A. Defining a test for HER-2/neu evaluation in breast cancer in the diagnostic setting. *Mod Pathol* 2001; 14(7):677-685.
- (76) Ellis IO, Dowsett M, Bartlett J, Walker R, Cooke T, Gullick W et al. Recommendations for HER2 testing in the UK. *J Clin Pathol* 2000; 53(12):890-892.
- (77) Diaz NM. Laboratory testing for HER2/neu in breast carcinoma: an evolving strategy to predict response to targeted therapy. *Cancer Control* 2001; 8(5):415-418.
- (78) Schnitt SJ, Jacobs TW. Current status of HER2 testing: caught between a rock and a hard place. *Am J Clin Pathol* 2001; 116(6):806-810.
- (79) Tubbs RR, Pettay JD, Roche PC, Stoler MH, Jenkins RB, Grogan TM. Discrepancies in clinical laboratory testing of eligibility for trastuzumab therapy: apparent immunohistochemical false-positives do not get the message. *J Clin Oncol* 2001; 19(10):2714-2721.
- (80) Ridolfi RL, Jamehdor MR, Arber JM. HER-2/neu testing in breast carcinoma: a combined immunohistochemical and fluorescence in situ hybridization approach. *Mod Pathol* 2000; 13(8):866-873.
- (81) Pauletti G, Dandekar S, Rong H, Ramos L, Peng H, Seshadri R et al. Assessment of methods for tissue-based detection of the HER-2/neu alteration in human breast cancer: a direct comparison of fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry. *J Clin Oncol* 2000; 18(21):3651-3664.
- (82) Sauer T, Wiedswang G, Boudjema G, Christensen H, Karesen R. Assessment of HER-2/neu overexpression and/or gene amplification in breast carcinomas: should in situ hybridization be the method of choice? *APMIS* 2003; 111(3):444-450.

- (83) Ross JS, Fletcher JA, Linette GP, Stec J, Clark E, Ayers M et al. The Her-2/neu gene and protein in breast cancer 2003: biomarker and target of therapy. *Oncologist* 2003; 8(4):307-325.
- (84) Bartlett J, Mallon E, Cooke T. The clinical evaluation of HER-2 status: which test to use? *J Pathol* 2003; 199(4):411-417.
- (85) Jacobs TW, Gown AM, Yaziji H, Barnes MJ, Schnitt SJ. Comparison of fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry for the evaluation of HER-2/neu in breast cancer. *J Clin Oncol* 1999; 17(7):1974-1982.
- (86) Hanna W, Kahn HJ, Trudeau M. Evaluation of HER-2/neu (erbB-2) status in breast cancer: from bench to bedside. *Mod Pathol* 1999; 12(8):827-834.
- (87) Ross JS, Fletcher JA. HER-2/neu (c-erbB-2) gene and protein in breast cancer. *Am J Clin Pathol* 1999; 112(1 Suppl 1):S53-S67.
- (88) van de Vijver MJ. Assessment of the need and appropriate method for testing for the human epidermal growth factor receptor-2 (HER2). *Eur J Cancer* 2001; 37 Suppl 1:S11-S17.
- (89) Schaller G, Evers K, Papadopoulos S, Ebert A, Buhler H. Current use of HER2 tests. *Ann Oncol* 2001; 12 Suppl 1:S97-100.
- (90) Mokbel K, Hassanally D. From HER2 to herceptin. *Curr Med Res Opin* 2001; 17(1):51-59.
- (91) Hayes DF, Thor AD. c-erbB-2 in breast cancer: development of a clinically useful marker. *Semin Oncol* 2002; 29(3):231-245.
- (92) Rampaul RS, Pinder SE, Gullick WJ, Robertson JF, Ellis IO. HER-2 in breast cancer--methods of detection, clinical significance and future prospects for treatment. *Crit Rev Oncol Hematol* 2002; 43(3):231-244.
- (93) Ross JS, Gray GS. Targeted therapy for cancer: the HER-2/neu and Herceptin story. *Clin Leadersh Manag Rev* 2003; 17(6):333-340.
- (94) Perez EA, Puzstai L, Van d, V. Improving patient care through molecular diagnostics. *Semin Oncol* 2004; 31(5 Suppl 10):14-20.
- (95) Lewis F, Jackson P, Lane S, Coast G, Hanby AM. Testing for HER2 in breast cancer. *Histopathology* 2004; 45(3):207-217.
- (96) Hicks DG, Tubbs RR. Assessment of the HER2 status in breast cancer by fluorescence in situ hybridization: a technical review with interpretive guidelines. *Hum Pathol* 2005; 36(3):250-261.
- (97) Kay EW, Walsh CJ, Cassidy M, Curran B, Leader M. C-erbB-2 immunostaining: problems with interpretation. *J Clin Pathol* 1994; 47(9):816-822.
- (98) Dowsett M, Bartlett J, Ellis IO, Salter J, Hills M, Mallon E et al. Correlation between immunohistochemistry (HercepTest) and fluorescence in situ hybridization (FISH) for HER-2 in 426 breast carcinomas from 37 centres. *J Pathol* 2003; 199(4):418-423.
- (99) Paik S, Bryant J, Tan-Chiu E, Romond E, Hiller W, Park K et al. Real-world performance of HER2 testing--National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project experience. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94(11):852-854.
- (100) Roche PC, Suman VJ, Jenkins RB, Davidson NE, Martino S, Kaufman PA et al. Concordance between local and central laboratory HER2 testing in the breast intergroup trial N9831. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94(11):855-857.
- (101) Keshgegian AA, Cnaan A. erbB-2 oncoprotein expression in breast carcinoma. Poor prognosis associated with high degree of cytoplasmic positivity using CB-11 antibody. *Am J Clin Pathol* 1997; 108(4):456-463.

- (102) Taylor SL, Platt-Higgins A, Rudland PS, Winstanley JH, Barraclough R. Cytoplasmic staining of c-erbB-2 is not associated with the presence of detectable c-erbB-2 mRNA in breast cancer specimens. *Int J Cancer* 1998; 76(4):459-463.
- (103) Penault-Llorca F, Adelaide J, Houvenaeghel G, Hassoun J, Birnbaum D, Jacquemier J. Optimization of immunohistochemical detection of ERBB2 in human breast cancer: impact of fixation. *J Pathol* 1994; 173(1):65-75.
- (104) Jacobs TW, Prioleau JE, Stillman IE, Schnitt SJ. Loss of tumor marker-immunostaining intensity on stored paraffin slides of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88(15):1054-1059.
- (105) Bertheau P, Cazals-Hatem D, Meignin V, de Roquancourt A, Verola O, Lesourd A et al. Variability of immunohistochemical reactivity on stored paraffin slides. *J Clin Pathol* 1998; 51(5):370-374.
- (106) Gancberg D, Lespagnard L, Rouas G, Paesmans M, Piccart M, Di Leo A et al. Sensitivity of HER-2/neu antibodies in archival tissue samples of invasive breast carcinomas. Correlation with oncogene amplification in 160 cases. *Am J Clin Pathol* 2000; 113(5):675-682.
- (107) Falo C, Moreno A, Lloveras B, Figueras A, Varela M, Escobedo A. Algorithm for the diagnosis of HER-2/neu status in breast-infiltrating carcinomas. *Am J Clin Oncol* 2003; 26(5):465-470.
- (108) Busmanis I, Feleppa F, Jones A, McGrath KM, Reed R, Collins J et al. Analysis of cerbB2 expression using a panel of 6 commercially available antibodies. *Pathology (Phila)* 1994; 26(3):261-267.
- (109) Press MF, Hung G, Godolphin W, Slamon DJ. Sensitivity of HER-2/neu antibodies in archival tissue samples: potential source of error in immunohistochemical studies of oncogene expression. *Cancer Res* 1994; 54(10):2771-2777.
- (110) Jacobs TW, Gown AM, Yaziji H, Barnes MJ, Schnitt SJ. Specificity of HercepTest in determining HER-2/neu status of breast cancers using the United States Food and Drug Administration-approved scoring system. *J Clin Oncol* 1999; 17(7):1983-1987.
- (111) Hoang MP, Sahin AA, Ordonez NG, Sneige N. HER-2/neu gene amplification compared with HER-2/neu protein overexpression and interobserver reproducibility in invasive breast carcinoma. *Am J Clin Pathol* 2000; 113(6):852-859.
- (112) O'Malley FP, Parkes R, Latta E, Tjan S, Zadro T, Mueller R et al. Comparison of HER2/neu status assessed by quantitative polymerase chain reaction and immunohistochemistry. *Am J Clin Pathol* 2001; 115(4):504-511.
- (113) Lebeau A, Deimling D, Kaltz C, Sendelhofert A, Iff A, Luthardt B et al. Her-2/neu analysis in archival tissue samples of human breast cancer: comparison of immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization. *J Clin Oncol* 2001; 19(2):354-363.
- (114) Roche PC, Ingle JN. Increased HER2 with U.S. Food and Drug Administration-approved antibody. *J Clin Oncol* 1999; 17(1):434.
- (115) Maia DM. Immunohistochemical assays for HER2 overexpression. *J Clin Oncol* 1999; 17(5):1650.
- (116) Espinoza F, Anguiano A. The HercepTest assay: another perspective. *J Clin Oncol* 1999; 17(7):2293-2294.
- (117) Wang S, Saboorian MH, Frenkel EP, Haley BB, Siddiqui MT, Gokaslan S et al. Assessment of HER-2/neu status in breast cancer. Automated Cellular Imaging System (ACIS)-assisted quantitation of immunohistochemical assay achieves high accuracy in comparison with fluorescence in situ hybridization assay as the standard. *Am J Clin Pathol* 2001; 116(4):495-503.

- (118) Lehr HA, Jacobs TW, Yaziji H, Schnitt SJ, Gown AM. Quantitative evaluation of HER-2/neu status in breast cancer by fluorescence in situ hybridization and by immunohistochemistry with image analysis. *Am J Clin Pathol* 2001; 115(6):814-822.
- (119) Bartlett JM, Watters AD, Ballantyne SA, Going JJ, Grigor KM, Cooke TG. Is chromosome 9 loss a marker of disease recurrence in transitional cell carcinoma of the urinary bladder? *Br J Cancer* 1998; 77(12):2193-2198.
- (120) Paik S, Tan-Chiu E, Bryant J. Successful quality assurance program for HER2 testing in the NSABP trial for Herceptin. *Proceedings of the 25th Annual San Antonio Breast Cancer Symposium. Breast Cancer Res Treat* 2002; 76(Suppl. 1).
- (121) Bartlett JM, Going JJ, Mallon EA, Watters AD, Reeves JR, Stanton P et al. Evaluating HER2 amplification and overexpression in breast cancer. *J Pathol* 2001; 195(4):422-428.
- (122) Pauletti G, Godolphin W, Press MF, Slamon DJ. Detection and quantitation of HER-2/neu gene amplification in human breast cancer archival material using fluorescence in situ hybridization. *Oncogene* 1996; 13(1):63-72.
- (123) Press MF, Slamon DJ, Flom KJ, Park J, Zhou JY, Bernstein L. Evaluation of HER-2/neu gene amplification and overexpression: comparison of frequently used assay methods in a molecularly characterized cohort of breast cancer specimens. *J Clin Oncol* 2002; 20(14):3095-3105.
- (124) Tanner M, Gancberg D, Di Leo A, Larsimont D, Rouas G, Piccart MJ et al. Chromogenic in situ hybridization: a practical alternative for fluorescence in situ hybridization to detect HER-2/neu oncogene amplification in archival breast cancer samples. *Am J Pathol* 2000; 157(5):1467-1472.
- (125) Isola J, Tanner M, Forsyth A, Cooke TG, Watters AD, Bartlett JM. Interlaboratory comparison of HER-2 oncogene amplification as detected by chromogenic and fluorescence in situ hybridization. *Clin Cancer Res* 2004; 10(14):4793-4798.
- (126) Zhao J, Wu R, Au A, Marquez A, Yu Y, Shi Z. Determination of HER2 gene amplification by chromogenic in situ hybridization (CISH) in archival breast carcinoma. *Mod Pathol* 2002; 15(6):657-665.
- (127) Dandachi N, Dietze O, Hauser-Kronberger C. Chromogenic in situ hybridization: a novel approach to a practical and sensitive method for the detection of HER2 oncogene in archival human breast carcinoma. *Lab Invest* 2002; 82(8):1007-1014.
- (128) Park K, Kim J, Lim S, Han S. Topoisomerase II-alpha (topoII) and HER2 amplification in breast cancers and response to preoperative doxorubicin chemotherapy. *Eur J Cancer* 2003; 39(5):631-634.
- (129) Arnould L, Denoux Y, MacGrogan G, Penault-Llorca F, Fiche M, Treilleux I et al. Agreement between chromogenic in situ hybridisation (CISH) and FISH in the determination of HER2 status in breast cancer. *Br J Cancer* 2003; 88(10):1587-1591.
- (130) Gong Y, Gilcrease M, Sneige N. Reliability of chromogenic in situ hybridization for detecting HER-2 gene status in breast cancer: comparison with fluorescence in situ hybridization and assessment of interobserver reproducibility. *Mod Pathol* 2005; 18(8):1015-1021.
- (131) Gupta D, Middleton LP, Whitaker MJ, Abrams J. Comparison of fluorescence and chromogenic in situ hybridization for detection of HER-2/neu oncogene in breast cancer. *Am J Clin Pathol* 2003; 119(3):381-387.

- (132) Mass R, Sanders C, Charlene K, Johnson L, Everett T, Anderson S. The concordance between the clinical trials assay (CTA) and fluorescence in situ hybridization (FISH) in the Herceptin pivotal trials. *Proc ASCO* 2000; 19(75a).
- (133) Mass R, Press M, Anderson S, Murphy M, Slamon D. Improved survival benefit from Herceptin (trastuzumab) in patients selected by fluorescence in situ hybridization. *Proc ASCO* 2001; 20(22a).
- (134) Vogel CL, Cobbleigh M, Tripathy D. Superior outcomes with Herceptin (trastuzumab) (H) in fluorescence in situ hybridization (FISH)-selected patients. *Proc ASCO* 2001; 20(22a).
- (135) Seidman AD, Fornier MN, Esteva FJ, Tan L, Kaptain S, Bach A et al. Weekly trastuzumab and paclitaxel therapy for metastatic breast cancer with analysis of efficacy by HER2 immunophenotype and gene amplification. *J Clin Oncol* 2001; 19(10):2587-2595.
- (136) Jimenez RE, Wallis T, Tabasczka P, Visscher DW. Determination of Her-2/Neu status in breast carcinoma: comparative analysis of immunohistochemistry and fluorescent in situ hybridization. *Mod Pathol* 2000; 13(1):37-45.
- (137) Mitchell MS, Press MF. The role of immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization for HER2/neu in assessing the prognosis of breast cancer. *Semin Oncol* 1999; 26(4 Suppl 12):108-116.
- (138) Fornier M, Risio M, Van Poznak C, Seidman A. HER2 testing and correlation with efficacy of trastuzumab therapy. *Oncology (Huntingt)* 2002; 16(10):1340-1342.
- (139) Hammock L, Lewis M, Phillips C, Cohen C. Strong HER-2/neu protein overexpression by immunohistochemistry often does not predict oncogene amplification by fluorescence in situ hybridization. *Hum Pathol* 2003; 34(10):1043-1047.
- (140) Paik S, Bryant J, Park C, Fisher B, Tan-Chiu E, Hyams D et al. erbB-2 and response to doxorubicin in patients with axillary lymph node-positive, hormone receptor-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90(18):1361-1370.
- (141) Wang S, Hossein SM, Frenkel EP, Haley BB, Siddiqui MT, Gokaslan S et al. Aneusomy 17 in breast cancer: its role in HER-2/neu protein expression and implication for clinical assessment of HER-2/neu status. *Mod Pathol* 2002; 15(2):137-145.
- (142) Persons DL, Bui MM, Lowery MC, Mark HF, Yung JF, Birkmeier JM et al. Fluorescence in situ hybridization (FISH) for detection of HER-2/neu amplification in breast cancer: a multicenter portability study. *Ann Clin Lab Sci* 2000; 30(1):41-48.
- (143) Watters AD, Going JJ, Cooke TG, Bartlett JM. Chromosome 17 aneusomy is associated with poor prognostic factors in invasive breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 2003; 77(2):109-114.
- (144) Bose S, Mohammed M, Shintaku P, Rao PN. Her-2/neu gene amplification in low to moderately expressing breast cancers: possible role of chromosome 17/Her-2/neu polysomy. *Breast J* 2001; 7(5):337-344.
- (145) Ma Y, Lespagnard L, Durbecq V, Paesmans M, Desmedt C, Gomez-Galdon M et al. Polysomy 17 in HER-2/neu status elaboration in breast cancer: effect on daily practice. *Clin Cancer Res* 2005; 11(12):4393-4399.
- (146) Vera-Roman JM, Rubio-Martinez LA. Comparative assays for the HER-2/neu oncogene status in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med* 2004; 128(6):627-633.
- (147) McCormick SR, Lillemoe TJ, Beneke J, Schrauth J, Reinartz J. HER2 assessment by immunohistochemical analysis and fluorescence in situ hybridization: comparison of HercepTest and PathVysion commercial assays. *Am J Clin Pathol* 2002; 117(6):935-943.

- (148) Lal P, Salazar PA, Ladanyi M, Chen B. Impact of polysomy 17 on HER-2/neu immunohistochemistry in breast carcinomas without HER-2/neu gene amplification. *J Mol Diagn* 2003; 5(3):155-159.
- (149) Sauer T, Beraki K, Furu I, Ormerod E, Jebsen PW, Naess O. Estimating loss of the wild-type p53 gene by in situ hybridization of fine-needle aspirates from breast carcinomas. *Diagn Cytopathol* 1999; 20(5):266-270.
- (150) McManus DT, Patterson AH, Maxwell P, Hamilton PW, Anderson NH, Caughley LM et al. Interphase cytogenetics of chromosomes 11 and 17 in fine needle aspirates of breast cancer. *Hum Pathol* 1999; 30(2):137-144.
- (151) Ichikawa D, Hashimoto N, Hoshima M, Yamaguchi T, Sawai K, Nakamura Y et al. Analysis of numerical aberrations of specific chromosomes by fluorescent in situ hybridization as a diagnostic tool in breast cancer. *Cancer* 1996; 77(10):2064-2069.
- (152) Phelan CM, Borg A, Cuny M, Crichton DN, Balderson T, Andersen TI et al. Consortium study on 1280 breast carcinomas: allelic loss on chromosome 17 targets subregions associated with family history and clinical parameters. *Cancer Res* 1998; 58(5):1004-1012.